

Российская академия наук
Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН
Общество физиологов растений России
Научный совет по физиологии растений и фотосинтезу
РАН

**ФУНДАМЕНТАЛЬНЫЕ И ПРИКЛАДНЫЕ ПРОБЛЕМЫ
СОВРЕМЕННОЙ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ
БИОЛОГИИ РАСТЕНИЙ**

Всероссийская научная конференция с
международным участием и школа для молодых
ученых,
посвященная 125-летию Института физиологии
растений им. К.А. Тимирязева РАН

Москва, 23-27 ноября 2015 г.

Сборник материалов

**Москва
2015**

Продукционные характеристики полупроточной культуры *Porphyridium purpureum* (Bory) Ross. при различной освещённости

Боровков А.Б., Гудвилович И.Н., Новикова Т.М.

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт морских биологических исследований им. Ковалевского РАН, Севастополь, Россия

ВВЕДЕНИЕ

Важнейшим фактором, определяющим продукционные свойства культур микроводорослей, является свет. Оптимизация процесса получения плотных культур микроводорослей, то есть таких, где единственным фактором, ограничивающим скорость роста является световой, весьма актуальна для промышленного выращивания ценных видов микроводорослей. Оптимальные условия для поддержания высокой скорости деления вегетативных клеток микроводорослей могут быть обеспечены не только изменением состава питательных сред, но и использованием определенных режимов культивирования, выбор которых во многом зависит от специфики организма и целей использования биомассы [1, 2]. Микроводоросли рода *Porphyridium*, в частности, *Porphyridium purpureum* (Bory) Ross. (синоним *Porphyridium cruentum* Näg.), являются уникальными модельными объектами при изучении роли пигментов в фотосинтезе. С практической точки зрения данный вид может служить источником ряда ценных физиологически активных веществ, в частности В-фикоэритрина и полисахаридов [3-5]. Известно, что относительное содержание и выход данного пигмента варьирует в достаточно широком диапазоне в зависимости от условий культивирования *P. purpureum* [4, 6-10]. Целью являлось изучение влияния поверхностной освещённости на содержание пигментов и продукционные характеристики полупроточной культуры микроводоросли *P. purpureum*.

МЕТОДЫ

Объект исследования – красная микроводоросль *Porphyridium purpureum* (Bory) Ross (штамм IBSS-70) из коллекции ФГБУН ИМБИ РАН. Установка для культивирования микроводорослей состояла из четырёх стеклянных фотобиореакторов плоскопараллельного типа с рабочим объемом 5 л и толщиной слоя 5 см, осветителя – лампы ДРЛ-700, термостабилизирующей и газораспределительной систем. Выращивание осуществляли на питательной среде по Тренкеншу [11] методом полупроточного (квазинепрерывного) культивирования, удельная скорость протока среды для всех культиваторов составляла 0,2 сут⁻¹.

В процессе выращивания культуру непрерывно снабжали газовой воздушной смесью с концентрацией углекислоты 2-3 %, pH среды поддерживали на уровне 8–9 ед, температуру – 26–28 °С. Средняя поверхностная освещённость культиваторов составляла 150, 50, 25 и 5 Вт/м². Содержание сухого вещества в культуре (СВ) определяли объемно-весовым [12], а также фотометрическими методами [13]. Пробы для определения содержания пигментов отбирали при достижении

культурой стационарного динамического равновесия. Содержание В-фикоэритрина (В-ФЭ) и хлорофилла *a* определяли спектрофотометрическим методом [6, 14]. Хлорофилл *a* экстрагировали из клеток микроводоросли ацетоном. Для количественного определения В-фикоэритрина в биомассе *P. purpureum* проводили её экстракцию фосфатным буфером (0,05 М; рН = 7-7,5). Спектры экстрактов пигментов промеряли на регистрирующем спектрофотометре СФ-2000 в диапазоне длин волн 400-800 нм с шагом 0,1 нм. Расчет концентраций пигментов проводили по формулам, предложенным [6, 14] по значениям оптической плотности на длинах волн, соответствующих максимумам поглощения пигментов. Определяемые показатели химического состава выражали в пересчете на органическое вещество (ОВ), вычитая из значения СВ массу зольного остатка. Рассчитывали средние арифметические (\bar{x}), стандартные отклонения (S), основные ошибки средних, доверительные интервалы для средних ($\Delta \bar{x}$). Все расчёты проводили для уровня значимости $\alpha=0,05$. В таблицах представлены средние значения и рассчитанные доверительные интервалы ($\bar{x} \pm \Delta \bar{x}$).

Таблица 1

Среда по Р.П. Тренкеншу (1984), используемая для культивирования *Porphyridium purpureum*

Компонент	Навеска, г·л ⁻¹
NaNO ₃	1,2
NaH ₂ PO ₄ × 2H ₂ O	0,45
Na ₂ EDTA	0,037
FeC ₆ H ₅ O ₇ × 7H ₂ O	0,0265
MnC ₁₂ × 4H ₂ O	0,0040
CoCl ₂ × 6H ₂ O	0,0031
(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ × 4H ₂ O	0,0009
K ₂ Cr ₂ (SO ₄) ₄ × 24H ₂ O	0,0017

РЕЗУЛЬТАТЫ

При проведении опыта при заданном ежесуточном 20 % обмене среды стационарное динамическое равновесие устанавливалось в культиваторах на 3-4 сутки. Плотность культуры увеличивалась (с ростом поверхностной освещенности) в 4,8 раза (таблица 2).

В проведённом эксперименте не было зарегистрировано значительного изменения относительного содержания В-ФЭ при варьировании поверхностной освещённости в диапазоне от 5 до 150 Вт/м². Экспериментально установлено, что с ростом поверхностной освещённости относительное содержание хлорофилла *a* и белка в клетках микроводоросли имеет тенденцию к снижению.

Для выявления оптимальных условий роста и накопления ценных веществ важнейшим показателем является продуктивность культуры как по биомассе, так и по целевому компоненту. Полученные экспериментальные данные позволили

рассчитать продуктивность культуры *P. purpureum* при различной поверхностной освещённости культиваторов (таблица 3). Экспериментально установлено, что с увеличением поверхностной освещённости культиваторов при заданном 20 % обмене среды наблюдается рост продуктивности культуры *P. purpureum* по биомассе, по В-фикоэритрину и по белку.

Таблица 2
Плотность полупротоочной культуры *Porphyridium purpureum* и содержание пигментов и белка при различной освещённости ($\omega=0,2$ сут⁻¹)

Поверхностная освещённость, Вт/м ²	Плотность культуры, г ОВ·л ⁻¹	Относительное содержание В-фикоэритрина, % ОВ	Относительное содержание хлорофилла <i>a</i> , % ОВ	Относительное содержание белка, % ОВ
150	2,53±0,09	7,26±0,26	0,64±0,02	24,5±0,8
80 (Гудвилович, 2014)	2,44±0,19	6,42±0,27	0,76±0,05	–
50	1,60±0,09	7,64±0,35	0,61±0,03	27,2±1,2
25	0,78±0,12	7,53±0,65	0,79±0,08	28,2±2,9
5	0,52±0,06	7,73±0,68	0,81±0,07	30,5±2,8

Таблица 3
Продуктивность полупротоочной культуры *Porphyridium purpureum* ($\omega=0,2$ сут⁻¹) при различной освещённости

Поверхностная освещённость, Вт/м ²	Продуктивность, мг·л ⁻¹ ·сут ⁻¹		
	Биомасса	В-фикоэритрин	Белок
150	506±14	36±1	120,6±4,2
80 (Гудвилович, 2014)	490±30	30±2	–
50	322±14	26±1	88,0±4,5
25	154±16	12±1	43,7±4,7
5	104±11	7±1	31,6±3,2

ОБСУЖДЕНИЕ

При квазинепрерывном культивировании происходит систематическое внесение биогенов в культуру микроводоросли, причём, поскольку удельная скорость протока *P. purpureum* была одинаковой для всех вариантов эксперимента, количество элементов минерального питания, вносимых ежедневно в четыре экспериментальных культиватора, было одинаковым. При таких условиях накопление биомассы микроводорослей может ограничиваться, а значит, и определяться поверхностной освещённостью культуры. Повышение поверхностной освещённости в 30 раз вызвало увеличение плотности культуры *P. purpureum* в 4,75 раза, что свидетельствует об ограничении скорости роста культуры при данных условиях интенсивностью освещения.

Свет является не только источником энергии для метаболических процессов, протекающих в клетке, но также и регулятором процессов. Механизм явления

световой адаптации далеко не ясен, однако многочисленные исследования указывают на однозначное действие света на пигменты: с ростом интенсивности света содержание пигментов в единице биомассы уменьшается. Такая реакция пигментов микроводорослей объясняется тем, что в них под действием интенсивного света наравне с синтезом происходит деструктивное фотоокисление пигментов [7, 9].

Вероятно, при увеличившейся плотности культуры (от 0,52 до 2,53 г ОВ·л⁻¹) *P. purpureum* на фоне роста поверхностной освещённости от 5 до 150 Вт/м² фотоадаптационные процессы были незначительны в связи с несущественно изменившимися условиями удельной освещённости клеток, что не вызвало значительного изменения содержания пигментов. Относительное содержание В-фикоэритрина при понижении освещённости от 150 до 5 Вт/м² практически не менялось, а хлорофилла *a* имело некоторую тенденцию к увеличению, отрицательно коррелируя с плотностью культуры.

Продуктивность культур микроводорослей может значительно варьировать при изменении условий культивирования. Увеличение поверхностной освещённости в 30 раз вызвало повышение продуктивности культуры *P. purpureum* по биомассе в 4,8 раза, по В-фикоэритрину – в 5 раз, по белку – в 3,8 раза.

Оптимизация лабораторного режима получения высокопродуктивных культур микроводорослей достигается за счет повышения эффективности использования культурой биогенных элементов и световой энергии. Используемая в опыте питательная среда рассчитана на получение 3-4 г биомассы микроводоросли *P. purpureum* с 1 л культуры [15]. При скорости протока среды $\omega=0,2$ сут⁻¹ в экспериментальные культиваторы поступало ежедневно 40 мг азота, что позволяло получать 0,6-0,8 г биомассы с 1 л культуры в сутки [15]. Реально полученная продуктивность культуры в эксперименте (0,5 г ОВ·л⁻¹ в сутки) при максимальной поверхностной освещённости в 1,2-1,6 раза ниже, чем расчетные значения (0,6-0,8 г/л в сутки). Это свидетельствует о наличии большого числа нерешенных проблем в данной области и оставляет простор для продолжения исследований и поиска путей повышения продуктивности культуры *P. purpureum*.

Таким образом, показано, что изменение поверхностной освещённости при квазинепрерывном выращивании *P. purpureum* с фиксированной подачей элементов минерального питания оказывает существенное влияние на продуктивность (скорость роста) культуры. С увеличением поверхностной освещённости от 5 до 150 Вт/м² продуктивность *P. purpureum* увеличилась в 5 раз по биомассе и В-фикоэритрину и в 3,8 раза по белку. Содержание В-фикоэритрина и хлорофилла *a* в биомассе *P. purpureum* в диапазоне поверхностной освещённости 5-150 Вт/м² существенно не менялось, а белка – снижалось на 20 %. Таким образом, продуктивность культуры по пигментам и белку в заданном диапазоне поверхностной освещённости определялась в большей степени скоростью роста культуры, чем накоплением в клетках соответствующих компонентов. Для максимизации выхода как биомассы, так и В-фикоэритрина в полупроточной культуре *P. purpureum*, необходимо учитывать, как интенсивность освещения, так и скорость роста микроводоросли.

ЛИТЕРАТУРА

1. Цоглин Л.Н., Пронина Н.А. Биотехнология микроводорослей. Москва: Научный мир, 2013. 184 с.
2. Гудвилович И.Н., Боровков А.Б. Продукционные характеристики *Porphyridium purpureum* (Bory) Ross в условиях накопительной и квазинепрерывной культуры // Альгология. 2014. Т. 24, № 1. С. 34–46.
3. Минюк Г.С., Дробецкая И.В., Чубчикова И.Н., Терентьева Н.В. Одноклеточные водоросли как возобновляемый биологический ресурс: обзор // Морской экологический журнал. 2008. Т. 7 (2). С. 5–23.
4. Судьїна О.Г., Шнюкова Э.І., Мушак П.О., Лось С.І., Фомішина Р. М., Тупік Н.Д., Лозова Г.І. Біохімія червоних водоростей. Киев, 2007. 320 с.
5. Borowitzka M.A. Microalgae as source of pharmaceutical and other biologically active compounds // J. Appl. Algol. 1995. V. 7. P. 3–15.
6. Стадничук И.Н. Фикобилипротеины. Биологическая химия. Москва: Мир, 1990. 196 с.
7. Algarra P., Ruediger W. Acclimation processes in the light harvesting complex of the red alga *Porphyridium purpureum* (Bory) Drew et Ross, according to irradiance and nutrient availability // Plant. Cell. Environ. 1993. V. 16 (2). P. 149–159.
8. Fabregas J., Garcia D., Morales E., Dominguez A., Otero A. Renewal rate of semicontinuous cultures of the microalga *Porphyridium cruentum* modifies phycoerythrin, exopolysaccharide and fatty acid productivity // J. Ferment. Bioeng. 1998. V. 86 (5). P. 477–481.
9. Jahn W., Steinbiss J., Zetsche K. Light intensity adaptation of the phycobiliprotein content of the red alga *Porphyridium* // Planta. 1984. V. 16 (6). P. 536–539.
10. Kathiresan S., Sarada R., Bhattacharya S., Ravishankar A. Culture media optimization for growth and phycoerythrin production from *Porphyridium purpureum* // Biotech. and Bioengin. 2006. V. 96. P. 456–463.
11. Тренкеншу Р.П., Терсков И.А., Фуряев Е.А., Ярунцов С.А. Ростовые и продукционные показатели водоросли *Porphyridium cruentum* в плотных культурах // Интенсивная светокультура растений. Красноярск, 1977. С. 191–200.
12. Тренкеншу Р.П., Беянин В.Н. Влияние элементов минерального питания на продуктивность водоросли *Platymonas viridis* Rouch. // Биология моря. 1979. Т. 51. С. 41–46.
13. Методы физиолого-биохимического исследования водорослей в гидробиологической практике. Киев: Наук. думка, 1975. 247 с.
14. Rowan K. S. Photosynthetic pigments of algae / K. S. Rowan. – Cambridge : Cambridge Univ. Press, 1989. – 334 p.
15. Упитис В.В., Пакалне Д.С., Шульце И.Ф. Оптимизация минерального питания красной морской водоросли *Porphyridium cruentum* // Известия АН Латвийской ССР. 1989. Т. 505 (8). С. 95–104.